



UPPSALA
UNIVERSITET

Aspects of Bacterial Resistance to Silver

Susanne Sütterlin



Antibiotikaresistens

största hot i dagens medicin

Uppkomst

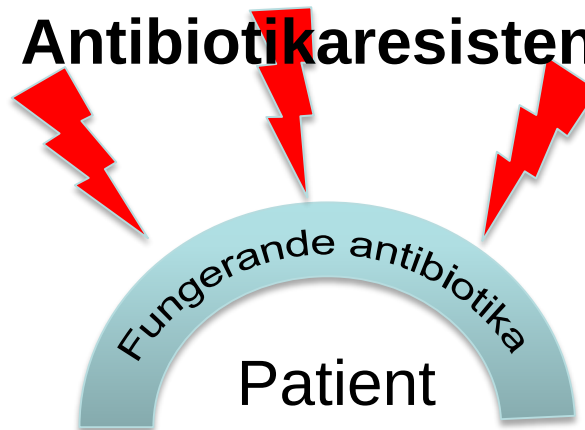
Överkonsumtion
av antibiotika
...

Biocider?

Spridning

Brister i hygien
Resor
Djurhållning
...

Antibiotikaresistens



Kan biocider vara en drivande faktor?

Biocider

Biocider är kemiska substanser som kontrollerar tillväxten av eller dödar bakterier.

Indelning:

Grupp I: Desinfektionsmedel

Grupp II: Konserveringsmedel

Grupp III: Skadebekämpningsmedel

Grupp IV: Övriga

European Directive 98/8/EC



UPPSALA
UNIVERSITET

Antibiotika

Läkemedel med acceptabla biverkningar

Ofta selektiv verkningsmekanism

Bakteriell resistens ofta specifik för målstruktur

Enzymproduktion

Förändring av målstrukturer

Förändring av metabolism

Permeabilitetsbarriärer eller aktiv efflux

Förändringar i cellväggsstrukturen

Antibiotika - Biocider

Biocider

Akut eller kronisk humantoxicitet vid intag

Flertal målstrukturer i bakterier

Bakteriell resistens ofta ospecifik

Permeabilitetsbarriärer eller aktiv efflux

Förändringar i cellväggsstrukturen

Samselektion av antibiotika och biocidresistens

- **Korsresistens**

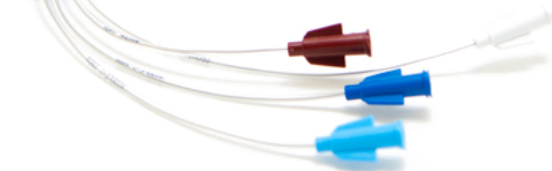
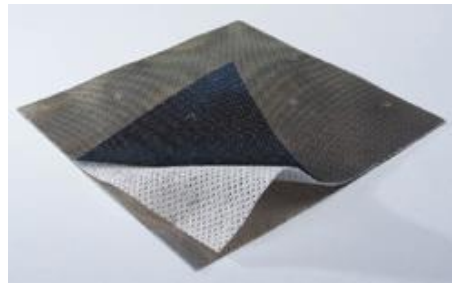
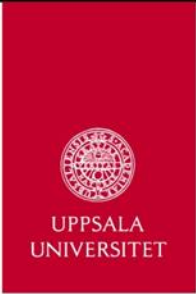
- Resistens mot flertal substanser som aktiveras av en substans

- **Samresistens**

- Olika resistensgener delar samma mobila element (plasmider, ..)

- **Samregulation**

- Aktivering av flertal regulationssystem genom en substans



AgNO_3

Silverniträt
Lunar caustic
Lapis infernalis



Silver i förbandsmaterial

“Det vetenskapliga underlaget är otillräckligt för att avgöra om det finns någon skillnad mellan silverförband och förband utan silver när det gäller effekter på andel läkta sår, sårstorlek, smärta, livskvalitet, andel infektioner och antibiotikaförbrukning vid behandling av kroniska sår. Orsaken är att det finns för få studier av tillräcklig kvalitet.”

*Silverförband vid behandling av kroniska sår.
2010. SBU Alert-rapport nr 2010-02. ISSN 1652-7151.*

Antibakteriella effekter av silver *in vivo* (I)

Sårbehandling av kroniska bensår med silverförband

- Grupp 1: Behandling under **3-5 veckor** (7 patienter)

	Beta-streptokocker							<i>S. aureus</i>							<i>P. aeruginosa</i>						
Patient	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
Innan	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-
Efter	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-

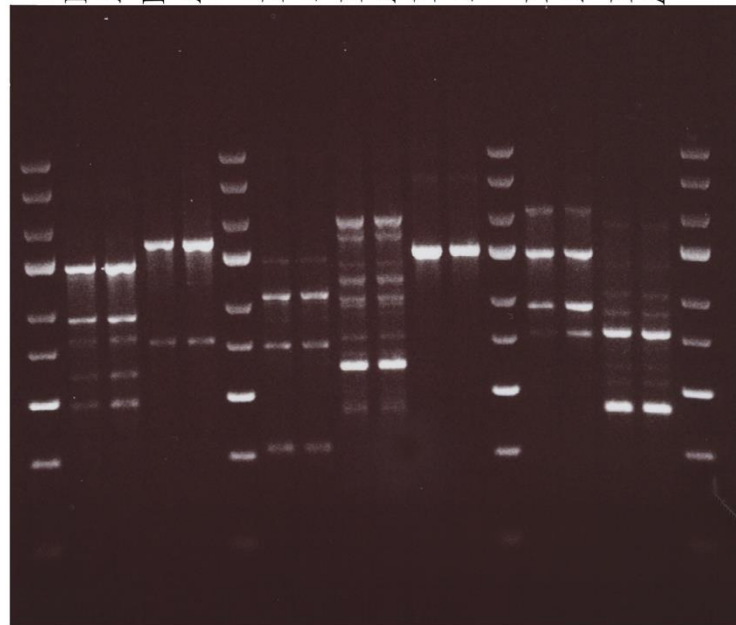
***Enterobacter cloacae* MIC silverniträt ≥ 512 mg/L**

- Grupp 2: Behandling under minst **2 månader** (7 patienter)

	Beta-streptokocker							<i>S. aureus</i>							<i>P. aeruginosa</i>						
Patient	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-

Antibakteriella effekter av silver *in vivo* (II)

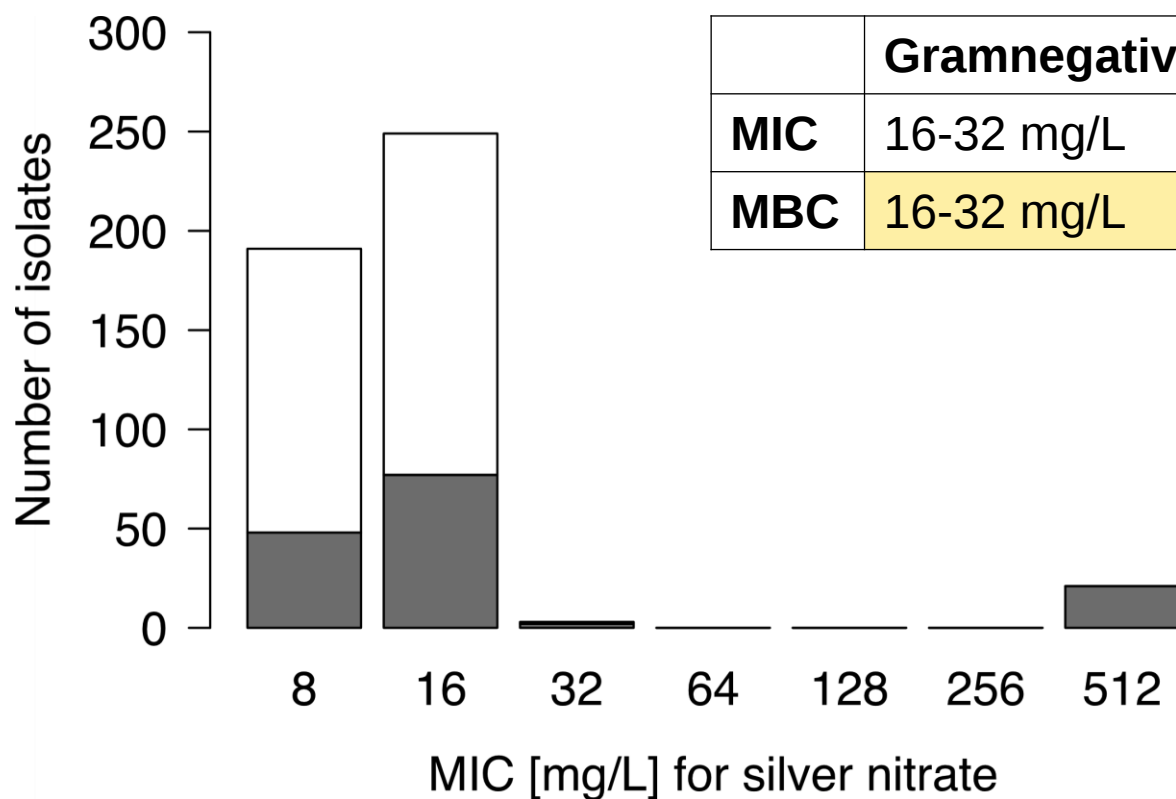
Strain	Patient 2		Patient 4					
	<i>S. aureus</i>		<i>Enterococcus sp.</i>				<i>Proteus sp.</i>	
Primer	ERIC-2		ERIC-1R		ERIC-2		A70-10	
	Before	After	Before	After	Before	After	Before	After



Exempel av gelelektroforesis av AP-PCR produkter.

Sårisolat innan och efter tre veckor behandling med silverförband.

MIC och MBC för silverniträt



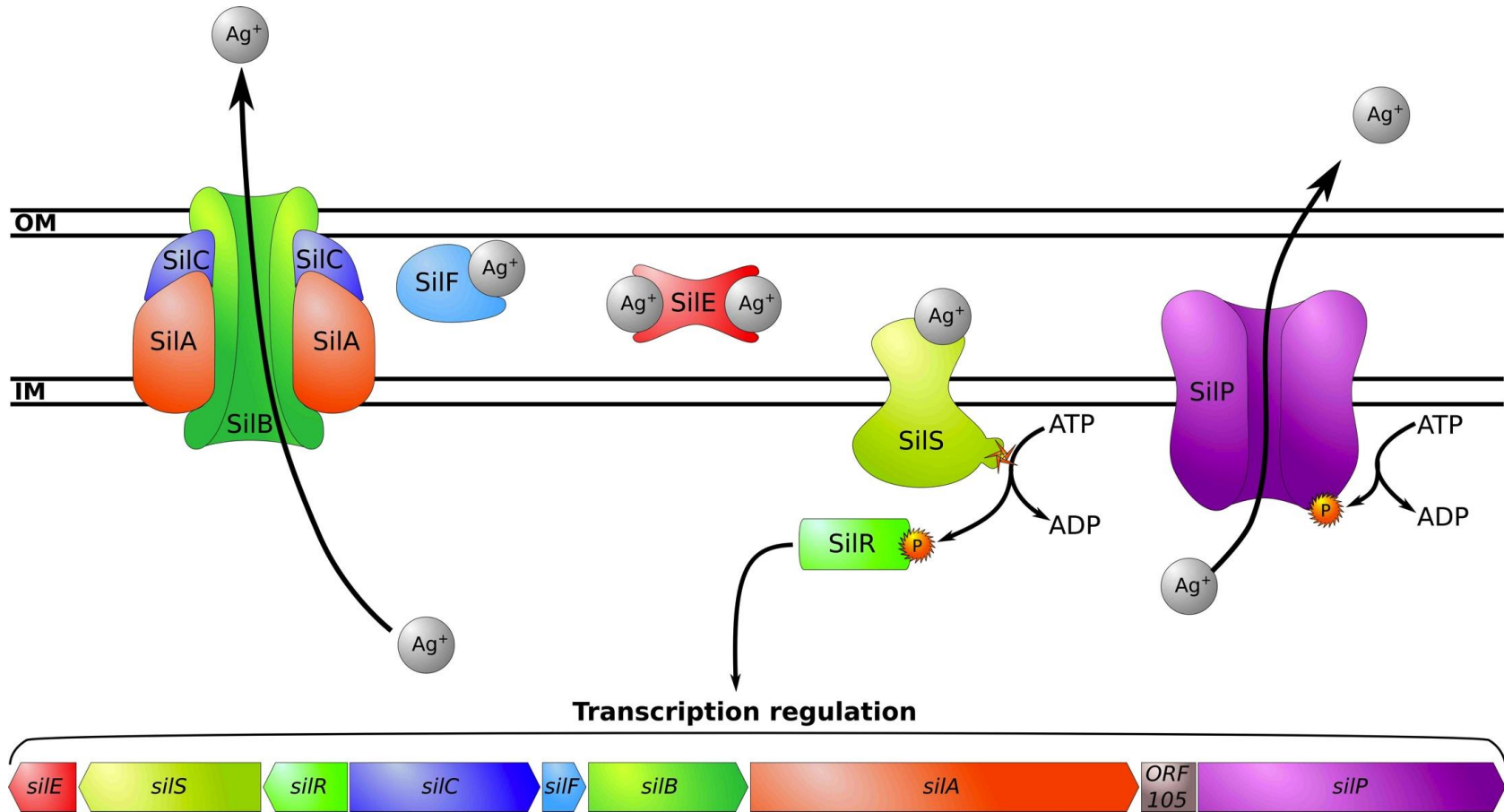
	Gramnegativ	Grampositiv
MIC	16-32 mg/L	8-32 mg/L
MBC	16-32 mg/L	> 512 mg/L

MIC-fördelning av silverniträt för *Enterobacteriaceae* familjen

Fenotypisk silverresistens

Stamkollektion	Art	MIC silvernitrat ≥ 512 mg/L
Sårisolat från patienter som behandlades med silverförband ($n = 56$) Acta Derm Venerol 2012; 92: 34-39	<i>E. cloacae</i>	$n = 1$
Fecesisolat från människor och fåglar ($n = 13$) AEM 2014; 80 (22): 6863-6869.	<i>E. coli</i>	$n = 0$
Blodisolat från Akademiska sjukhuset 1990 – 2010 ($n = 443$) submitted	<i>E. cloacae</i>	15/99 (15%)
	<i>E. aerogenes</i>	2/29 (7%)
	<i>K. pneumoniae</i>	2/95 (2%)
	<i>K. oxytoca</i>	2/59 (3%)
	<i>E. coli</i>	0/160

Genetisk silverresistens



Siloperonet och föreslagna transkriptionsprodukter.

Genetisk silverresistens (I)

- Silgener hittades enbart i isolat från *Enterobacteriaceae* familjen
 - E. cloacae* (76/131; 58%) – *submitted*
 - K. oxytoca* (39/79; 49%) – *submitted*
 - E. coli* (10/223; 5%) – *submitted*
 - E. coli* (13/105; 12%) – *AEM 2014; 80 (22): 6863-6869.*
- Silgener kunde hittas i alla isolat med fenotypisk silverresistens
- Alla isolat positiva för silgener utvecklade fenotypisk resistens under provokation

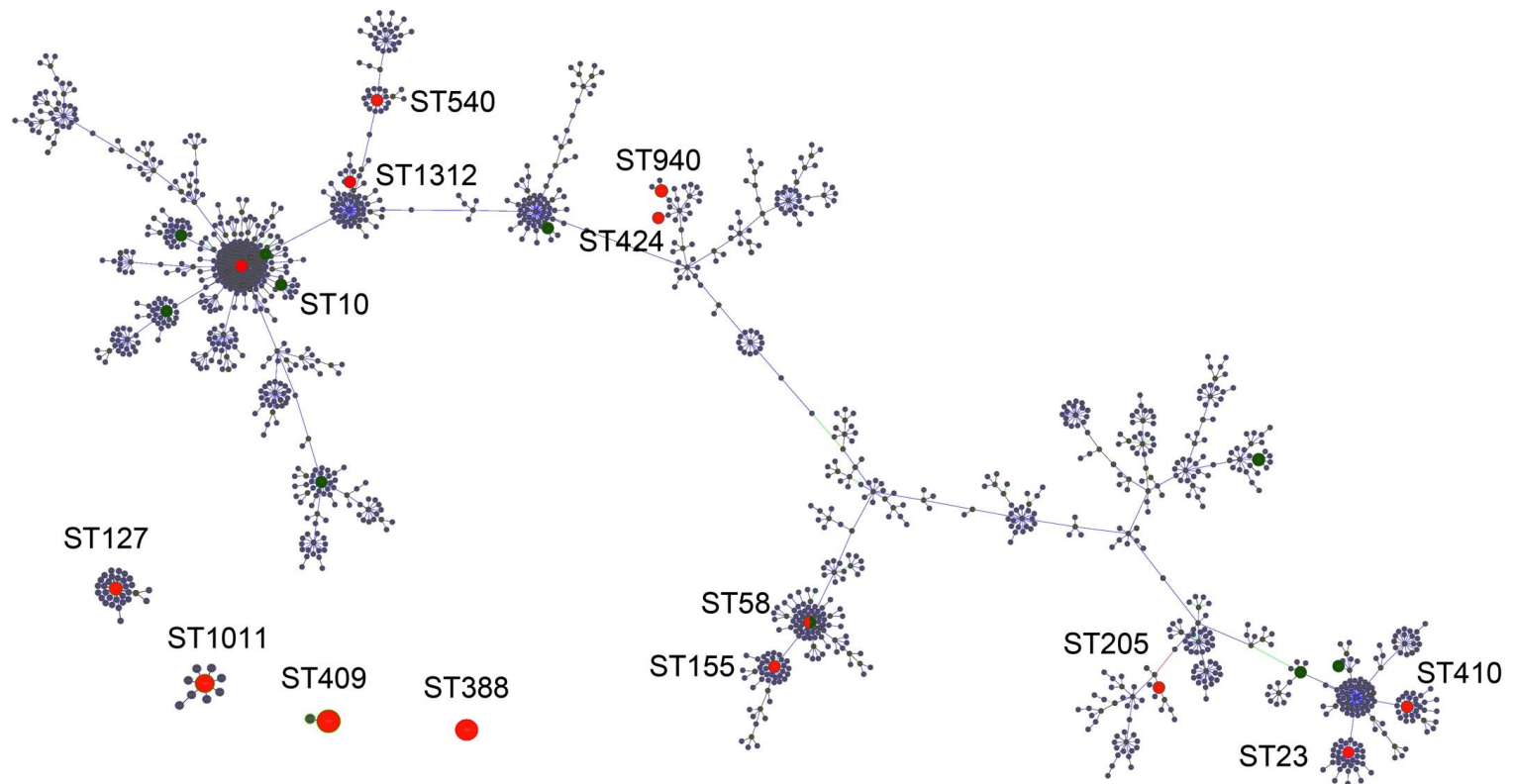
Genetisk silverresistens (II)

Silgener hittades **INTE** i fecesisolat från **fåglar** (AEM 2014; 80 (22): 6863-6869)

- Silgener hittades **INTE** i isolat tillhörande **vattenmiljöer** (submitted)
- Faktorer som var associerade med fynd av *sil*-gener (submitted):
 - **Lägst frekvens** fanns i blodisolat från patienter på **neonatologien** (24%)
 - **Högst frekvens** fanns i blodisolat från patienter på **hematologi/onkologi** (66%)
 - Blodisolat från **kvinnor var oftare *sil* positiv** än blodisolat från män (69/133 vs. 97/244; $p = 0,03$)



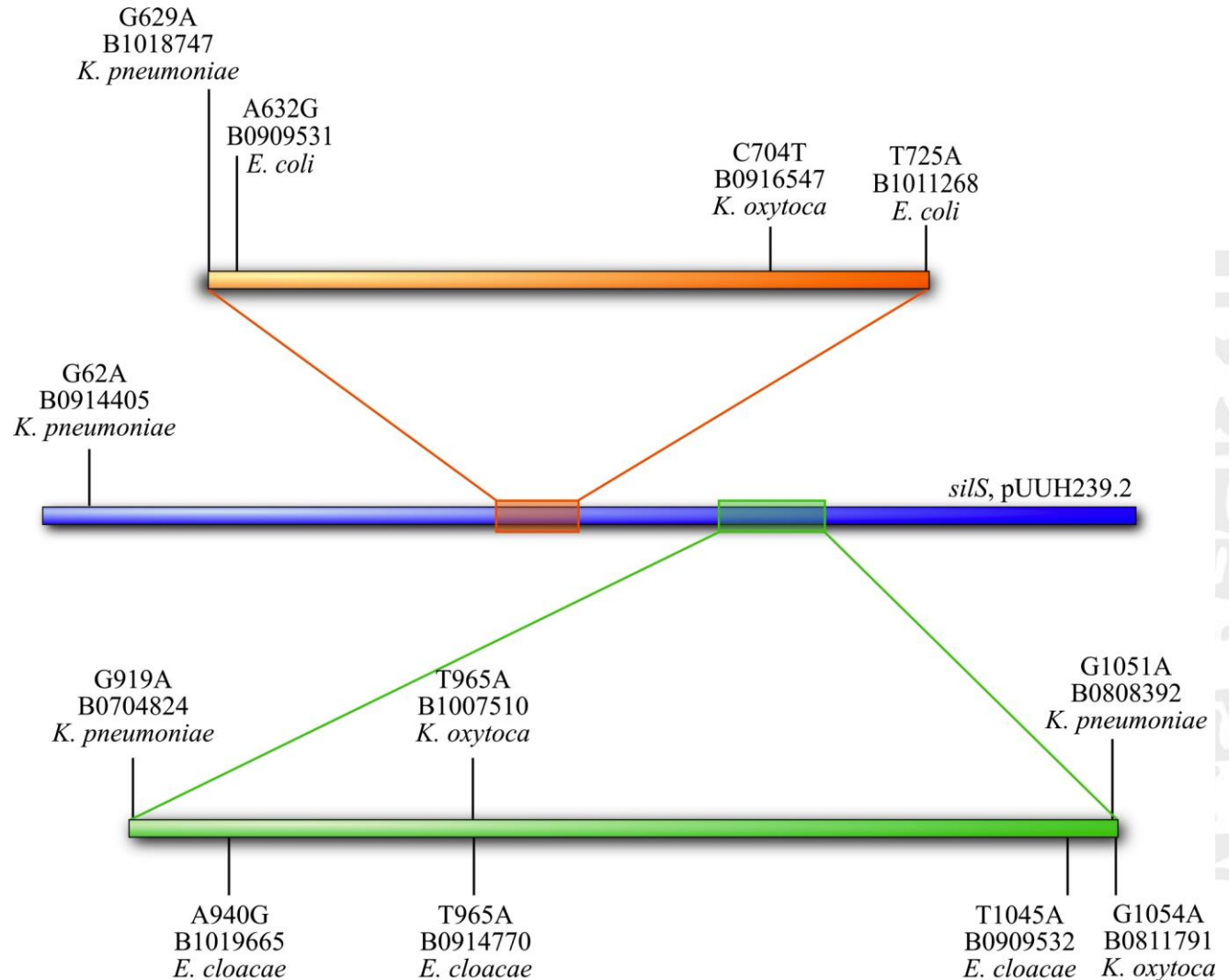
Klonala aspekter



Minimal spanning tree illustration av *E. coli*. Sekvenstyper av sil-positiva isolat är markerade med röda prickar.



SNPs i *silS*



Lokalisation av
SNPs i *silS*.

Samselektion av antibiotika och silver

- **Hälften av isolaten** med fenotypisk silverresistens visade **samresistens** mot antibiotika (11/22) (Acta Derm Venerol 2012; 92: 34-39, submitted)
- ***In vitro* provokation** med silvernitrat kunde orsaka **förändringar i resistensmönstren** för antibiotika och föranleda **porinförluster** (Acta Derm Venerol 2012; 92: 34-39, AEM 2014; 80 (22): 6863-6869)
- **Silgener** var **överrepresenterade i CTX-M** producerande *E. coli* (AEM 2014; 80 (22): 6863-6869)
- Isolat positiva för silgener var oftare resistent mot **trimetoprimsulfa** och **gentamicin**
- Vi hittade **ingen** association mellan **silverresistens** och **kvicksilverresistens**

Sammanfattning

- Silvernitratt har *in vitro* **bakteriostatisk** effekt på **grampositiva** bakterier och baktericid effekt på gramnegativa bakterier
- **Silverförband** haft **begränsad *in vivo* aktivitet**, ingen eradikering av grampositiva eller gramnegativa bakterier kunde ses
- Fenotypisk och genetisk **silverresistens kunde bara hittas i *Enterobacteriaceae* familjen**, mest frekvent var silverresistens för *Enterobacter spp.* och *Klebsiella spp.*

Sammanfattning

- Genetisk **silverresistens** hittades mest frekvent i **humana isolat**, men inte i isolat från fåglar eller vattenmiljöer
- **Silgener** är associerade med fenotypisk **silverresistens**. Selektade mutanter för silverresistens hade **SNPs i silS**-genen.
- Möjliga länkar för **samselektion** kunde hittas för **betalaktamer, trimetoprimsulfa, gentamicin och silver**

Tack!

Handledare

Åsa Melhus
Björn Olsen

KMB, UAS

Eva Tano
Petra Edquist
Hong Yin
Markus Klint
Ylva Molin

Sårcentrum, UAS

Åsa Boström
Anna-Brita Tallberg
Agneta Bergsten

SciLifeLab, Uppsala

Christian Tellgren-Roth
Martin Dahlö

Barnsjukhuset, Changchun City, Kina

Xiao-Jie Zhang
Li-Hong Li
Li-Wei Sun

Linus Sandegren, IMBIM, UU

Mirva Drobni, IMV, UU

Thomas Tängdén, Infektionskliniken, UAS

Delarbeten

Sütterlin, S., Tano E., Bergsten, A., Tallberg, A.-B., Melhus, Å. (2012)
Effects of silver-based wound dressings on the bacterial flora in chronic leg ulcers and its susceptibility *in vitro* to silver.

Sütterlin, S., Edquist, P., Sandegren, L., Adler, M., Tängdén, T., Drobni, M., Olsen, B., Melhus, Å. (2014)
Silver resistance genes are overrepresented among *Escherichia coli* isolates with CTX-M production.

Sütterlin, S. and Yin, H., Zhang, X.-J., Li, L.-H., Sun, L.-W., Melhus, Å. (2015)
High carriage rate of CTX-M-producing *Escherichia coli* in Chinese preschool children.

Sütterlin, S., Dahlö, M., Tellgren-Roth, C., Melhus, Å. (2015)
High frequency of silver resistance in invasive isolates belonging to genera *Klebsiella* and *Enterobacter*.